

分子標的化学療法班報告

班長 西山正彦

研究班班員

西山正彦	広島大学原爆放射能医学研究所 分子情報
長町幸雄	群馬大学医学部第一外科
浅尾高行	群馬大学医学部第一外科
栗原 稔	昭和大学豊州病院消化器科
山本 亘	昭和大学豊州病院消化器科
峠 哲哉	広島大学原爆放射能医学研究所 腫瘍外科
金 隆史	広島大学原爆放射能医学研究所 腫瘍外科

研究成果

1. 抗癌剤耐性（効果）規定因子

平成九年度（初年度）には、① MMCでは NADPH/キノン・オキシド・リダクターゼ (NQO) とグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST, GST π), ② CDDP では GST, ③ TXT では細胞のチューブリン量と GST, が抗腫瘍効果を規定しており, 有用な分子標的となりうることを示した。しかしながら, 5-FU ではジハイドロピリミジン・デハイドロゲナーゼ (DPD), CPT-11 では細胞膜電位差が耐性（効果）に関与することは示唆されたものの両剤の耐性規定因子の確定には至らなかった。検討を継続し, 次のような結論を得た。

5-FU の耐性因子は DPD のみではなく, 多剤耐性随伴蛋白 (MRP) さらにはチミジレイト・シンターゼ (TS) も重要な耐性因子であることが明らかとなった²⁾。定常状態の腫瘍細胞において DPD と MRP は, その遺伝子発現量, 酵素活性ともに細胞の 5-FU 感受性 (耐性) ときわめてよく相関した (図 1)。一方, TS ではそうした相関性は認められなかったものの, 5-FU 耐性細胞を 5-FU に接触させると TS 遺伝子の発現は著明に増加した (図 2)。この TS 遺伝子発現の著明な増加は, 5-FU 高感受性細胞では認められなかった。したがって, DPD と MRP は腫瘍細胞固有のレベルが高いことによって, TS は遺伝子発現の著明な増加をきたす 5-FU に対する過敏な反応によって, 細

はじめに

消化器癌に対する「分子標的化学療法」研究班の目的は, 腫瘍細胞の抗癌剤への応答を規定する分子を求め, それを標的に特異的な修飾を加える治療モデルを確立することにある。分子標的の索定とその修飾法の確立の二段階に分けて研究を行い, マイトマイシン C (MMC), 5-フルオロウラシル (5-FU), シスプラチン (CDDP), 塩酸イリノテカン (CPT-11), ドセタキセル (TXT) を対象として, 平成九年度 (初年度) には臨床応答にもっとも深くかかわる耐性因子候補を各薬剤ごとに明らかにした¹⁾。

本年度はその確定作業とともに, それらを標的とした効果増強療法について研究を進めた。

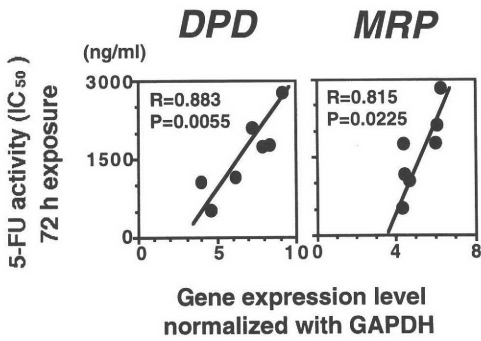


図 1 5-フルオロウラシル (5-FU) 耐性規定因子：消化器癌細胞における遺伝子発現と5-FU耐性

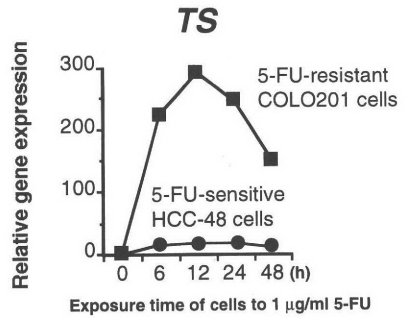


図 2 5-フルオロウラシル (5-FU) 持続接触によるチミジレート・シンターゼ (TS) 遺伝子の発現変化

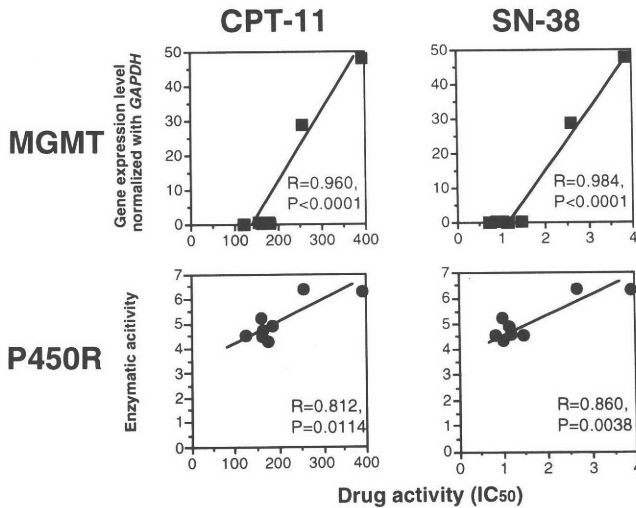


図 3 塩酸イリノテカン (CPT-11) 耐性規定因子：消化器癌細胞における遺伝子発現, 酵素活性とCPT-11耐性

胞の5-FU耐性に深く関与するものと考えられた。

CPT-11耐性では細胞内に移行・貯留する薬剤濃度の低下が重要な意味をなす。これに細胞膜電位差が深くかかわることは前年度の研究で明らかとなった。しかしながら、本態性耐性細胞のなかには細胞内薬剤濃度の低下が認められないものもあり、それらの細胞では、NADPH/シトクロムP450リダクターゼ (P450R) およびO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (MGMT) の遺伝子発現量の増加が認められた (論文投稿中)。対象細胞株全体でも、各細胞のP450RとMGMTの遺伝子発現量あるいは酵素活性はCPT-11耐性 (感受性) と有意に相関し

ており、両者ともにCPT-11の重要な耐性規定因子であることが明らかとなった (図3)。P450RはシトクロムP450による薬剤代謝に、MGMTはCPT-11の標的であるトポイソメラーゼIに関連してDNA修復に影響を与えるものと考えられる。

これら抗癌剤耐性 (効果) 規定因子の同定により、治療前遺伝子診断による症例個々の各抗癌剤への感受性評価や有効な薬剤の選択が現実的なものとなり、効果増強のために修飾すべき分子標的も明確となった。

2. 分子標的化学療法

耐性規定因子の確定にはその機能の阻害あるい

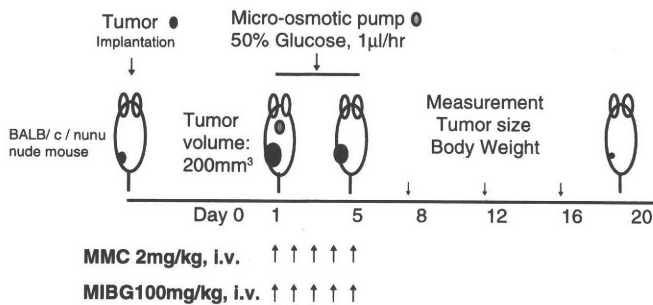


図 4 NADPH/キノン・オキシド・リダクターゼ(NQO)を標的としたマイトマイシンC分子標的的化学療法

表 1 マイトマイシンC分子標的的化学療法の効果 (ヌードマウス実験系)³⁾

	Tumor Growth Inhibition(1-T/C, %)					
	MMC	MMC+ MIBG+ Glucose	KW 2149	5-FU	DOX	CDDP
KB	69*	64	62	49	55	51
MKN 45	69*	57	39	40	58	48
CH-4(HCC-48)	42	80*	79	8	44	24
EH-6(HEC-46)	10	60*	52	4	43	16
CH-5(HCC-50)	44	62*	59	18	28	33
H-111(HSC-42)	19	68*	43	12	27	8
COLO 201	58	62	69*	25	54	59
COLO 320 DM	70	68	80*	34	43	61

* , greatest inhibition rate in each xenograft ; MMC, mitomycin C ; MIBG, m-iodobenzylguanidine ; 5-FU, 5-fluorouracil ; DOX, doxorubicin ; CDDP, cis-DDPlatinum.

は増強による抗癌剤効果の変化の証明が必須である。そうした作業は同時に耐性因子の機能制御すなわち耐性因子を標的とした効果増強療法の策定作業でもある。したがって、耐性規定因子の確定段階で、①NQOが耐性規定因子である場合：NQOの関与するMMC活性化がpH依存性であることから、腫瘍環境pHを低下させる、②GSTが耐性規定因子である場合：GSTの関与するMMC, CDDP, TXTに対する耐性はエタクリン酸によりGST活性を阻害する、③DPDが耐性規定因子である場合：DPDの関与する5-FU耐性は5-エチニルウラシル(5-EU)によりDPD活性を阻害する、④P450Rが耐性規定因子である場合：P450Rの関与するCPT-11耐性はメチラポンによりP450R活性を阻害する、⑤細胞膜電位差が耐性規定因子である場合：細胞膜電位差の関与するCPT-11耐性は膜作用植物性アルカロイ

ドであるセファランチンにより膜電位差を増大させる、ことで抗腫瘍効果の増強が得られることが示された²⁻⁵⁾。一方、MRPやMGMTなどはそのアンチセンスによって制御可能と考えられた。こうした結果および推論に基づき、臨床に応用可能な治療法について絞り込みを行った。

① MMCを用いた分子標的的化学療法

図4に、MMCを用いたNQOを標的とする分子標的的化学療法の治療モデルを示した³⁾。腫瘍細胞では糖負荷によって乳酸産生が増大することから、ミトコンドリア呼吸阻害剤であるm-ヨードベンジルグアニジン(MIBG)とブドウ糖投与を併用することによって腫瘍のみのpHの低下が得られ、抗腫瘍効果は増強された。GSTを標的とするエタクリン酸を用いた治療は、正常腎細胞障害をも増強することから臨床応用は困難と考えられたが、これらGST活性の高い腫瘍に対しては、グル

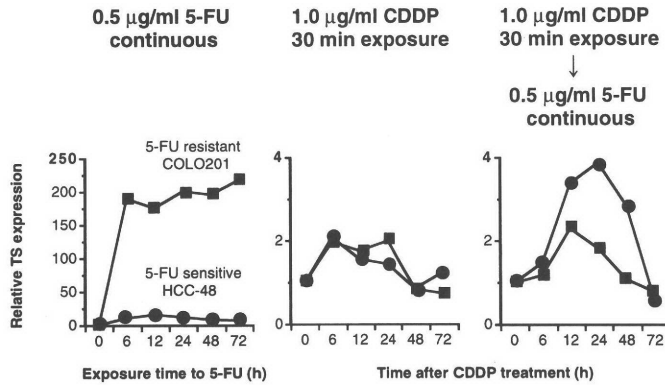


図 5 低用量シスプラチン(CDDP)先行投与+5-フルオウラシル (5-FU) 持続投与と5-FU 耐性因子 TS の遺伝子発現

タチオンによって活性化される新規開発 MMC 誘導体 KW 2149 が高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。表 1 はヌードマウス実験系で得られたその効果である。耐性因子に関する腫瘍の特性に対応した治療の抗腫瘍効果をもっとも高かった。

② 5-FU を用いた分子標的化学療法

今のところ MRP に関しては、残念ながらその機能的意義の解明には至っていない。また、TS は 5-FU との接触によって変化する因子であることから未治療検体ではその変化を予測することが難しい。したがって、効果予測因子として DPD, MRP を用い、効果増強のための標的としては DPD, TS に焦点を絞った。エタクリン酸による GST 阻害と同様に、5-EU による DPD 活性阻害は 5-FU の効果を増強するが正常組織での 5-FU 代謝をも著しく阻害するため臨床的意義は乏しいと考えられた。5-FU 耐性因子の制御にもっとも効果的な方法は、臨床ですでに用いられている他の抗癌剤との併用療法であった。すなわち、低用量 CDDP 先行投与+5-FU 持続投与方法である(論文投稿中)。5-FU 耐性細胞ではその 5-FU 接触によって耐性規定因子 MRP, DPD, TS の遺伝子発現量の有意な増加が認められる。しかしながら、少量の CDDP 投与を先行させることにより、5-FU が誘導するそうした遺伝子発現の増加が抑制され、安定した相乗作用が得られることが明らかとなった。図 5 に TS 遺伝子発現の変化を示した。

細胞固有の MRP, DPD レベルが極端に高くない限りにおいて、低用量 CDDP 先行投与+5-FU 持続投与方法は有効なアプローチであった。

③ CDDP を用いた分子標的化学療法

CDDP はきわめて有用な抗癌剤である。その作用は多岐にわたり、自身の抗腫瘍効果のみではなく他の薬剤の効果発現にも大きくかわり、併用薬剤としての用途は広い。しかしながら、その耐性規定因子 GST を標的とする安全かつ有用な効果増強療法は見出せず、CDDP については細胞の GST レベルによって使用するか否かを決定する以外に具体的な治療指針を示すことはできなかった。

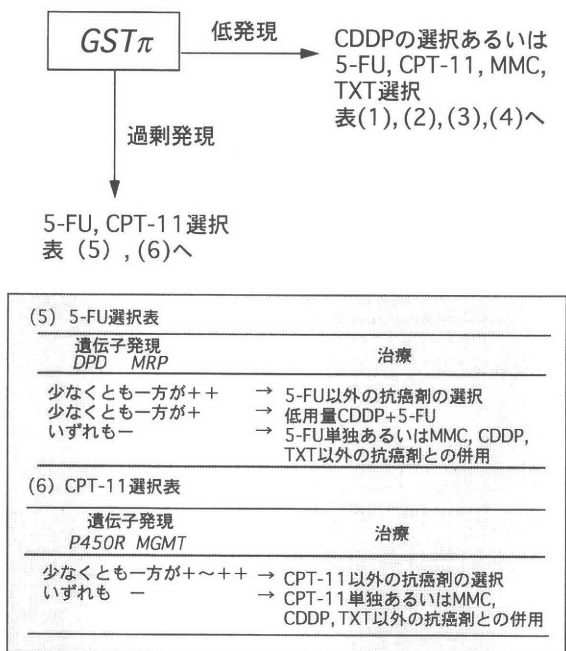
④ TXT を用いた分子標的化学療法

チューブリンと GST が標的となる(論文投稿中)。チューブリンは TXT の作用標的であり、その遺伝子発現がきわめて低いあるいは過剰な細胞での効果は期待できないことが示された。GST を標的とする特異的修飾療法は CDDP と同様に臨床応用は困難と考えられたが、GST π 中等度発現細胞では耐性因子を共有しない 5-FU との併用が相乗効果を示すことが明らかとなった(論文投稿中)。治療の選択肢に加えるとともに、GST π を標的とする分子標的治療開発のための重要な知見を与えるものとして、作用機序の解明を急いでいる。

⑤ CPT-11 を用いた分子標的化学療法

細胞内薬剤濃度の低下による CPT-11 耐性は、

表 2 遺伝子発現解析による抗癌剤応答の予測に基づく化学療法の選択



(1) 5-FU選択表

遺伝子発現 DPD MRP	治療
少なくとも一方が++	→ 5-FU以外の抗癌剤の選択
少なくとも一方が+	→ 低用量CDDP+5-FU
いずれも-	→ 5-FU単独あるいは他の抗癌剤との併用

(2) CPT-11 選択表

遺伝子発現 P450R MGMT	治療
少なくとも一方が+~++	→ CPT-11以外の抗癌剤の選択
いずれも -	→ CPT-11単独あるいは他の抗癌剤との併用

(3) MMC選択表

遺伝子発現 NQO1 GSTπ	治療
++ > +	→ MIBG + Glucose + MMC療法
+++ -	→ MMC単独あるいは他の抗癌剤との併用
- any	→ MMC以外の抗癌剤の選択

(4) TXT選択表

遺伝子発現 β-tubulin GSTπ	治療
+++ any	→ TXT以外の抗癌剤の選択
+~+++ -~+	→ TXT+5-FU
- any	→ TXT以外の抗癌剤の選択

膜輸送系蛋白過剰発現の有無にかかわらずほとんどが細胞膜電位差の低下を伴っていた。したがって、セファランチンとの併用による効果増強化学療法が可能と考えられた⁴⁾。しかしながら、別のCPT-11 耐性規定因子 P 450 R と MGMT に関しては、それらの生体での安全かつ効果的な制御法の確立には至っていない。P 450 R 活性を抑制するメチラポンは重篤な生体障害をもたらし、MGMT に対するアンチセンスなどの広義の遺伝子療法ははまだ検討段階の域をでない。CPT-11 を用いた分子標的療法も今後の検討課題である。

3. 遺伝子診断と治療の選択

以上の研究結果をもとに個々の抗癌剤応答に関する生物学的特性に基づいて消化器癌化学療法の選択のフローチャートをまとめると表 2 のようになる。GSTπ, DPD, MRP, P450R, MGMT, NQO1, β-tubulin の 7 遺伝子について発現解析を行い、腫瘍ごとに耐性因子の優位性に基づいて増強化学療法(耐性克服療法)や作用機序の異なる抗癌剤など治療を選択する。いずれにも当てはまらないものは抗癌剤投与はしない。この有用性

評価は臨床での証明を待たねばならないが、本研究における耐性因子の解析は、獲得耐性細胞系ではなく臨床での耐性細胞から樹立した細胞系から求められたものであり、標的修飾に必要とされた薬剤はすでに臨床で用いられているものである。その臨床展開の可能性は高く、消化器癌の治療成績の向上に貢献しうると考えている。

おわりに

化学療法への応答を規定する特徴的な分子を求め、それを標的に特異的な修飾を加える治療モデルを確立するという本研究班の目的は、いくつかの課題は残ったものの、2年の期間内にほぼ達成された。新治療系としての可能性を十分に示唆する結果を示すことができたと考えている。しかしながら、臨床に応用するためにはいくつかの問題点がある。① 多量検体の遺伝子発現解析の具体的方法、② 遺伝子診断基準の設定、③ その標準化、④ 複数の治療候補からのもっとも効果的な治療の選択法、などである。

臨床応用を目指すには、検体の採取から治療効

果の確認までを実際に試行し、方法論の簡便化と具体的手技の確立をはかるべきと考えている。使用抗癌剤を絞ったパイロット・スタディへの展開を強く望むものである。

文 献

- 1) 西山正彦. 分子標的化学療法班報告. *W'Waves*, 4: 63-68, 1998.
- 2) Kiriara Y, Yamamoto W, Toge T, Nishiyama M. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), multi-drug resistance-associated protein (MRP) and thymidilate synthase (TS) gene expression can predict 5-fluorouracil resistance in human gastro-intestinal cancer cells. *Int J Oncol*, 14: 551-556, 1999.
- 3) Nishiyama M, Suzuki K, Kumazaki T, Yamamoto W, Toge T, Okamura T, Kurisu K. Molecular targeting of mitomycin C chemotherapy. *Int J Cancer*, 72: 649-656, 1997.
- 4) Aogi K, Nishiyama M, Kim R, Hirabayashi N, Toge T, Mizutani A, Okada K, Sumiyoshi H, Fujiwara Y, Yamakido M, Kusano T, Andoh T. Overcoming CPT-11 resistance by using a biscolaurine alkaloid, cepharanthine, to modulate plasma membrane potential. *Int J Cancer*, 72: 295-300, 1997.
- 5) 西山正彦. 臨床からみた抗癌剤耐性理論—耐性理論の臨床的解析と対策—. *消化器外科*, 21: 1293-1303, 1998.